

ENDOTOXINE MEASUREMENT

**Publication number:** JP58085162 (A)

**Publication date:** 1983-05-21

**Inventor(s):** NAKAHARA CHIZUKO; TANAKA SHIGENORI; TAMURA HIROSHI; MATSUMOTO AKIYOSHI +

**Applicant(s):** SEIKAGAKU KOGYO CO LTD +

**Classification:**


- **international:** G01N33/50; G01N33/52; G01N33/579; G01N33/50; G01N33/52; G01N33/579; (IPC1-7): G01N33/50


- **European:** G01N33/579


**Application number:** JP19810182190 19811116


**Priority number(s):** JP19810182190 19811116


**Also published as:**

 JP63055671 (B)

 JP1506779 (C)

 EP0080649 (A1)

 EP0080649 (B1)

 US4495294 (A)

more >>

**Abstract of JP 58085162 (A)**

**PURPOSE:**To detect accurately and with good reproductivity the endotoxine in a specimen by using a limulus amebocyte lysate component by means of using a specimen that is a living body specimen treated by acid under the condition that limulus solidification type enzyme substrate cutting activity has become not to be detected. **CONSTITUTION:**A body liquid specimen such as blood, abdominal dropsy, urine, etc. is treated at a pH value under 3 with the existence of an acid such as mono-, di-, and tri-chloroacetic acids that has pKa value under 3 at 25 deg.C, or a strong acid such as chloric acid, perchloric acid, hydrochloric acid, sulfuric acid, etc. in order to adjust the specimen so that the limulus solidification type enzyme substrate cutting activity is not detected. To this specimen a limulus amebocyte lysate component is added to measure the solidification reaction.; With this arrangement is becomes possible to detect exactly endotoxine in a living body specimen by dissolving or removing obstructing substances for endotoxine that are proteins, cell granules, etc. with adsorptivity to endotoxine without giving unfavorable effects to the endotoxine.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—85162

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号  
6422—2G

⑭ 公開 昭和58年(1983)5月21日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 16 頁)

⑮ エンドトキシン測定法

⑯ 発明者 田村弘志

東大和市立野 3—1293—10 東大  
和グリーンタウン 2—408

⑰ 特 願 昭56—182190

⑱ 出 願 昭56(1981)11月16日

⑲ 発明者 松本章義

⑳ 発明者 中原千鶴子

日野市多摩平 5—2—12

日野市三沢850高幡台団地 3—4  
02

㉑ 出 願 人 生化学工業株式会社

㉒ 発明者 田中重則

東京都中央区日本橋本町二丁目  
九番地八

東京都板橋区板橋 1—49—14

㉓ 代理人 弁理士 小田島平吉 外 1 名

明 細 書

1. 発明の名称

エンドトキシン測定法

2. 特許請求の範囲

1. カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて生体試料中に存在するエンドトキシンを測定する方法に於て、該試料中のカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件下に酸処理した生体試料を用いることを特徴とする方法。

2. 該酸処理が、 $pKa$  2.5 値が 3 以下の酸を用いて  $pH$  3 以下の条件下に行われる特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、實際上、従来なし得なかつた優れた正確性、信頼性及び再現性をもつて、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて、生体

試料中に存在するエンドトキシンを測定すること  
を可能としたエンドトキシンの測定法に関する。

更に詳しくは、本発明は、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて生体試料中に存在するエンドトキシンを測定する方法に於て、該試料中のカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件下に酸処理した生体試料を用いることを特徴とする方法に関する。

1968 年、Levin によりカプトガニ・アメボサイト・ライゼートを用いるエンドトキシン

(細菌内毒素) の特異的インビトロ検出法が報告され、それ以来、リムルテスト (LAL-Test) として、医学、薬学の基礎及び応用分野において簡便且つ迅速なエンドトキシン測定法として利用され、例えば、米国に於ては、医療器具や生物製剤のパイロジェンテストに、制約条件付きではあるが、LAL-Test の代用が公認されるにまで

至っている。

このようなエンドトキシンの特異的検出法の出現により敗血症、肝硬変症などの重篤症状についての病因論的研究が臨床医学研究者間に於て、近年とくにさかんとなっている。そして、生体試料中のエンドトキシンと疾病症状との関連性を探究する目的で、生体試料中のエンドトキシンを *LAL-Test* により測定しようとする試みが数多く行われてきた。そのような試みに際して、エンドトキシンの存在にも拘わらず、カプトガニ・アメボサイト・ライゼートのエンドトキシンによるゲル化現象が阻害されたり、或は又、エンドトキシンが存在しないのにゲル化現象が生じたりするいわゆる阻害現象や誤陽性現象がおこるといったラブルのあることが判明してきた。

更に、このようなラブルには、その原因物質が存在するのであろうとの仮説のもとに、生体試

が進んだ結果、該ゲル化現象に関与するエンドトキシンの作用を受ける因子と該ゲル化現象に於ける酵素系の役割とが明確となり、生化学的解析の結果からも、従来の *LAL-Test* による生体試料中のエンドトキシンの検出測定の妥当性に多くの疑問が生ずるに至っている。

すなわち、カプトガニ・アメボサイト・ライゼートのエンドトキシンによるゲル化現象の発生機構についての生化学的解析の結果、カプトガニ・アメボサイト・ライゼートのゲル化機構は、哺乳動物の血液凝固系に類似した数種の不活性因子からなる系から構成されており、エンドトキシンの特異的な因子が先ず、エンドトキシン量に比例して活性化され、次いで段階的に順次不活性因子（プロ・エンザイム）が活性因子（エンザイム）に変換され、最終因子（プロ・クロツテイングエンザイム）を活性化し、活性化クロツテイングエ

特開昭58- 85162(2)

料の前処理によつてそのようなラブルの原因となる原因物質を除去しようという試みもなされたが、その目的が達成されているという評価は未だなされていない。それどころか、そのような前処理の試みを加えた生体試料を用いた *LAL-Test* による臨床病理学的成績は、敗血症、胆管痛、播種性血管内凝固症候群、肝硬変症等の患者血液試料中のエンドトキシンレベルが、臨床症状や菌培養の結果や他のパラメディカルデータと一致しないケースが多く見られ、*LAL-Test* による生体試料中のエンドトキシンの検出の有用性をも疑われつつあるのが現状である。

斯くして、生体試料を用いる *LAL-Test* の臨床診断への適用の可否について、再検討を要する時期に至っている。更に、近年、カプトガニ・アメボサイト・ライゼートのエンドトキシンによるゲル化現象の発生機構についての生化学的解析

ンザイムが凝固性蛋白前駆体コアギュロゲンを基質として作用してコアギュリン・モノマーとし、この物質が重合してゲル状蛋白となることが明らかになつた [ *S. Iwanaga et al Febs. Letter. 120, 217 (1980)* ]。

斯くして、プロクロツテイングエンザイムがエンドトキシンにより直接活性化を受けてクロツテイングエンザイムとなり、これがコアギュロゲンに作用してゲル化を生ずるという従来から云われてきた作用機構とは異つた機構によつて上記ゲル化現象が起こることが解明された。

更に、カプトガニ・アメボサイト・ライゼートの凝固系と、哺乳動物の血液凝固系の対比により、前者におけるコアギュロゲンが後者におけるフィブリノゲンに、前者におけるクロツテイングエンザイムが後者における  $X\alpha$  因子に、そして前者におけるプロクロツテイングエンザイム活性化酵素が

後者におけるトロニンに、夫々、類似した性質を有することが判明した。これらの新たに判明した事実の妥当性は、哺乳動物の血液中に存在する上記凝固系因子やトリプシンなどの蛋白水解酵素によつても、カプトガニ・アメボサイト・ライゼートはゲル化することから確認される。

又更に、生体試料にエンドトキシン調製品（例えば、大腸菌からのエンドトキシン *E. coli* O<sub>111</sub>, B<sub>4</sub>; Difco 社製品）を添加し、LAL-Test を用いて、該生体試料中のエンドトキシンを検出し、その検出度から該試料中のエンドトキシン量を推定する方法が採用されているが、血液試料を用いて該方法を行つた場合、添加したエンドトキシン量に見合った検出レベルが確認されず、LAL-Test によるゲル化が阻害されることが判明している。

上述のように、従来の LAL-Test による生

体試料中のエンドトキシンの検出測定の妥当性には多くの疑問が生ずるに至つており、生体試料を用いる LAL-Test の臨床診断への適用の可否もしくは意義について再検討を要する時期に至っているのが実情であり、生体試料中のエンドトキシンの測定に際して、該試料中に存在するカプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分による凝固系に關与する因子を正確に除去しなければ、LAL-Test によつて、正確に且つ信頼性及び再現性をもつて、エンドトキシンを検出測定することができないのは勿論のこと、測定の意味さえも全く失われるであろうことは明らかである。

本発明者等は、向一出願人の先に開発したカプトガニ・アメボサイト・ライゼート利用の合成基質を用いるエンドトキシンの高感度検出定量方法（特開昭54-15797号；米国特許第4188264号；西ドイツ国特許公告公報DE274

0323号）を利用して、従来、LAL-Test に際して、生体試料前処理法として公知の前処理法について詳細な検討を行つた。

その結果、従来、血液前処理法として評価されてきたクロロホルム処理法〔J. Levin, et al; J. Lab. Clin. Med., 75, 903 (1970)〕、酸性化法〔P. B. Reinhold et al; Proc. Soc.-exp. Biol. Med., 137, 334 (1971)〕、加熱法〔M. S. Cooperstock, Lancet (i) 1272 (1975)〕により前処理した血液試料を用いて、エンドトキシンを正確に且つ信頼性をもつて検出測定することは、実験上、不可能であるという重大な事実を発見した。

更に研究を進めた結果、後に Examples に於て実験的に詳しく示すとおり血液試料にエンドトキシンの既知量を添加し、上記従来法により前処理した検体試料中のエンドトキシン検出レベルを、

上記合成基質法による定値により検討した結果、クロロホルム処理法、酸性化法のいずれの場合にも、血液試料中に存在するカプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分の凝固系に作用する妨害因子が残存し、エンドトキシンの真の存在量を、正確に且つ信頼性をもつて検出測定することは不可能であることがわかつた。又、上記加熱法の場合には、血液試料中の妨害酵素活性を完全に失活させることができるが、この試料を用いたエンドトキシン検出レベルは、該試料の種類や希釈度の差異により、対照に比して $\frac{1}{2}$ ～3倍というような大巾な数値変動を示し、エンドトキシンの真の存在量を信頼度よく検出測定できないことがわかつた。

本発明者等は、従来慣用されてきた前処理した血液試料を用いたエンドトキシン検出測定における上述の如き技術的トラブルを克服し得る新しい前処理手段を開発することによつて正確に且つ信

頼性をもつて、且つ又、優れた再現性をもつて、生体試料中に存在するエンドトキシンをカプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて測定する方法を提供すべく更に研究を行つてきた。

その結果、生体試料を、該試料中にカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件下で酸処理した試料を用いることによつて、正確に且つ優れた信頼性をもつて、再現性良く、該試料中に存在する真のエンドトキシン量を、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて検出測定できることを発見した。更に、この方法は実際の臨床的应用においても充分な評価をうけられる優れた方法であることがわかつた。

斯くして、本発明者等の研究によれば、前述したように、従来 *LAL-Test* の臨床診断への適用の有用性が疑問視されていた多くのトラブルが一挙に解決でき、それ自体公知の凝固法（ゲル化

法）或は合成基質法などにより、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて生体試料中に存在するエンドトキシンを検出測定して、医薬、医学の基礎及び臨床診断を含む応用分野に大きく貢献することが可能となることがわかつた。

従つて、本発明の目的は顯著に改善されたエンドトキシンの測定方法を提供するにある。

本発明の上記目的及び更に多くの他の目的ならびに利点は、以下の記載から一層明らかとなるであらう。

カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて、凝固法或は合成基質を用いて生体試料中に存在するエンドトキシンを検出測定する方法それ自体は、よく知られており、例えば、丹羽允「臨床検査」、23、343～348（1979）、“リムルステストによる内毒素微量定量”；

*Bacterial Endotoxins Test/Biological*

*Tests, US PXX*、<85>；米国特許第4188264号（特開昭54-15797号；西ドイツ特許公告 *DE* 2740323号）などに詳細に記載されており、本発明方法の実施に利用できる。

本発明方法においては、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート成分を用いて、上記の如きそれ自体公知の方法で生体試料中に存在するエンドトキシンを検出測定するに際して、該生体試料を該試料中にカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件下で酸処理する。

既述の従来公知の酸性化法に於ては、1 ml の血漿を 0.1 ml の 2.5 % 氷酢酸（2.9 N、 $pH$  2.2）を用いて、 $pH$  4.0 で処理され、引き続いて中和される。この酸性化法によつては、後に実験的に示すとおり、カプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出され、真のエンドトキシン量の測定に影響

を与える因子が存在することを示す。従つて、この酸性化法によつて処理された生体試料を用いて真のエンドトキシン量を測定することはできない。

本発明方法において、生体試料を、該試料中のカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件下に酸処理するに際して、好ましくは、 $pKa^{25^\circ C}$  値が3以下の酸を用いて、 $pH$  3以下の条件下で処理するのがよい。

このような酸処理に用いる酸の例としては、モノ-、ジ-、トリ-クロル酢酸の如き  $pKa^{25^\circ C}$  値が3以下の中酸や塩素酸、臭素酸の如きハロゲン酸、過塩素酸の如き過ハロゲン酸、塩酸、硫酸、硝酸などの如き  $pKa^{25^\circ C}$  値が1以下の強酸を例示することができる。

本発明においては、生体試料中に存在し得る蛋白質類や細胞顆粒が有するカプトガニ・アメボサイト・ライゼートによる測定に影響を与える因子

が失活するような酸化作用乃至変性作用をこれら夾雑成分に及ぼし、これらを不溶性沈殿物として測定系外に除去し得るような酸処理が行われる。このために、生体試料中のカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件下に酸処理が行われる。利用する酸の種類、濃度、処理条件などを適宜に選択することによつて、生体試料中のカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる処理が可能となることが発見された。

生体試料中にカプトガニ凝固系酵素基質切断活性が検出されなくなる条件は、使用する酸について、予め実験的に容易に設定することができる。上記予備実験は、例えば以下のようにして行うことができる。試料のアミダーゼ活性を、あらかじめ合成基質 *Boc-Leu-Gly-Arg-PNA* を用いて測定し、次いで、該試料を使用する適当な酸を用いて  $pH 3$  以下の条件下で温度、時間条件を選

択して処理し、生じた沈殿を速沈除去した後、上清の  $pH$  を塩基を用いて中和し再度合成基質を用いて処理済み試料中にアミダーゼ活性が確認出来なくなる条件の範囲を設定する。

本発明方法によれば、例えば上述のようにして予め設定された条件に従つて、前記例示の如き酸を用いて酸処理を行い、処理系中に沈殿してくる変性失活沈殿物を、例えば、濾紙濾別、遠心分離の如き手段で処理系から除去したのち、 $pH$  を中性条件に戻した生体試料を用いて、それ自体公知の手法を利用して該生体試料中のエンドトキシンをカプトガニ・アメガサイト・ライゼート成分を用いて測定することができる。

従来法で処理された生体試料を用いた場合とは異なつて、本発明方法に従つて酸処理された生体試料を用いることによつて、生体試料中の阻害原因物質や変陽性原因物質の影響から解放されて、

正確に且つ優れた信頼性をもつて、再現性良く、生体試料中に存在する真のエンドトキシン量を、カプトガニ・アメガサイト・ライゼート成分を用いて検出測定することができる。

本発明で利用する生体試料としては、例えば、血漿、血清、血液成分であるアルブミン、グロブリンなどの試料、腹水、関節液、尿などの循環液や体内外の浸出排泄液の如きエンドトキシンが豊富されやすい蛋白質や細胞顆粒を含む生体試料を例示することができる。

本発明方法によれば、病気の種類、生体試料の種類などに影響されることなしに、生体試料中のエンドトキシンを優れた正確さ、高い信頼性をもつて再現性よく且つ迅速に検出測定することが可能となる。

本発明方法は、広い範囲のエンドトキシン血症患者の生体試料中のエンドトキシンの検出及び測

定に利用することができ、このような患者症例としては、例えば、以下の如き症状を例示することができる。

菌血症、腹膜炎、髄膜炎、尿路感染症、術後感染症の如きグラム陰性細菌の感染により発症した疾病、肝炎、肝硬変等の肝疾患の原因として網内系不全が予測される疾病、胆道系に生ずる急性化膿性胆管炎、胆嚢炎総胆道管結石症等と腸内細菌群の因果関係予測、腸閉塞症、潰瘍性大腸炎、肺炎 *DIC* (播種性血管内凝固症候群)、癆、糖尿病、腎炎等の末期の網内系機能不全の判定に用いられる。

以下、比較例と共に実施例により、本発明方法の数例について更に詳しく例示する。

#### (1) 生体試料の採取、調製：一

健康人或は患者の体液(血漿、血清、腹水、関節液、髄液、尿)を細菌やエンドトキシンの汚染

を伴わないように充分注意して採取する。

例えば、血漿は、ヒトの前腕肘静脈から真空採血管(ベソジエクトチューブ:テルモ(株)製品、日本)を用いて、各種抗凝固剤(ヘパリン、クエン酸ナトリウム、EDTA-2・ナトリウム等)を収容した試験管に採取し、遠心下(1500~1800rpm、10分間)に血球と血漿に分離し、血小板を含む画分を採取して血漿試料(PRP)とした。又、血清は、ヒトの肘静脈から採取した静脈血を清浄なガラス製スピッツ試験管に採取し、室温に30分間静置して凝固を生じさせ、生じた血餅を、2500~3000rpm、10分の条件で遠心し、上澄液を別の試験管に分取して血清試料とした。

腹水、関節液、髄液は、局部穿刺により採取した分泌渗出液を用いた。

#### (2) エンドトキシンの測定:—

本、製品)に対する基質切断活性を示す。上記(1)エンドトキシンの測定に準じて測定した遊離PNA(パラニトロアニリン)量を対応するエンドトキシン*E. coli* O<sub>111</sub>B<sub>4</sub>量に換算した値で示した。

#### (4) 生体試料の処理:—

##### (4-1) 本発明例〔過塩素酸(PCA)処理法〕

前記(1)の生体試料0.1mlに、5%過塩素酸水溶液を終濃度が1.5%となるように添加し、37℃で20分間インキュベートした。形成された沈殿物を、3000rpm、15分の条件で遠心し、上澄液を採取してこれを0.2NのNaOH水溶液を用いてpH6.5~8.0の中性附近に中和し、酸処理生体試料を得た。

##### (4-2) 本発明例〔トリクロル酢酸(TCA)処理法〕

前記(1)の生体試料0.1mlに、5%トリクロル酢

特開昭44-15797(米国特許第4,188

264号;西ドイツ国特許公告公報DE2740323号)に基いて商品化されたエンドトキシン微量定量試薬パイロデック(PYRODICC商品名:生化学工業株式会社、日本、製品)を用いて、合成基質法によるLAL-Testにより行つた。大腸菌からのエンドトキシン*E. coli* O<sub>111</sub>B<sub>4</sub>に換算した値で示した。

#### (3) カプトガニ凝固系酵素基質切断活性及びその測定:—

カプトガニ凝固系酵素基質切断活性(以下、アミダーゼ活性と略称することがある)は、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート非存在下に、カプトガニ・アメボサイト・ライゼート中に存在する凝固蛋白コアギュロゲンの切断部分構造をモデルとして調製されたペプチド性合成基質Boc-L-*eu*-Gly-Arg-PNA(生化学工業株式会社、日

酸水溶液を同量添加し、45℃で10分間インキュベートした。形成された沈殿物を、3000rpm、15分の条件で遠心し、上澄液を採取してこれを0.1NのNaOH水溶液を用いてpH6.5~8.0の中性附近に中和し、酸処理生体試料を得た。

##### (4-3) 本発明例〔硝酸(HNO<sub>3</sub>)処理法〕

前記(1)の生体試料0.1mlに、3%HNO<sub>3</sub>水溶液の同量を添加し、40℃で10分間インキュベートした。形成された沈殿物を、3000rpm、15分の条件で遠心し、上澄液を採取してこれを0.2NのNaOH水溶液を用いてpH6.5~8.0の中性附近に中和し、酸処理生体試料を得た。

##### (4-4) 比較例〔クロロホルム処理法〕

*J. Lab. Clin. Med.*, 75 903 (1970)に記載されたところに従つて、前記(1)の生体試料(ヘパリン血漿)4容に対し、クロロホルム1容を加え、25℃で60分間はげしく振盪撹拌した

のち、1,100 $\text{r}$ で10分間、遠心すると、三層に分離する。この中間層を分取して、クロロホルム処理生体試料とする。

(4-5) 比較例〔酸性化処理法〕

*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 137,

334 (1971) に記載されたところ従つて、前記(1)の生体試料 0.1 ml に、2.5% 水酢酸 (2.9 N, pH 2.2) 0.1 ml を添加して系の pH を 4.0  $\pm$  0.1 に低下させ、続いて 50% (W/V) 無水二塩基性磷酸カリ緩衝液 (50%  $K_2HPO_4$ , pH 9.4) の 0.2 ml を添加して血漿の pH を 6.2  $\pm$  0.1 に戻して酸性化処理生体試料を得た。

(4-6) 比較例〔加熱処理法〕

*Lancet* 11272 (1974) に記載されたところ従つて、前記(1)の生体試料 (血漿) をバイロジエンフリーの滅菌蒸留水を用いて 3 倍に希釈し、100 $^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱して加熱処理生体試

料を得た。

(4-7) 比較例〔アルカリ処理法〕

前記(1)の生体試料 0.2 ml に、0.2 N の NaOH 水溶液 0.2 ml を添加して、37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベートしたのち、0.2 N HCl 水溶液 0.2 ml を加えて pH 6.5  $\sim$  8.0 の中性附近に中和し、アルカリ処理生体試料を得た。

実施例 1 及び比較例 1  $\sim$  4

前記(4)の (4-1)  $\sim$  (4-3) に記載した本発明例の酸処理生体試料、前記 (4-4)  $\sim$  (4-7) に記載した比較例処理生体試料及び無処理の前記(1)の生体試料の夫々について、前記(3)に従つて、アミダーゼ活性を測定した。その結果は、下掲第 1 表のとおりであつた。

第 1 表

| 生体試料                            | 血漿 | 血清 | 尿 | 腹水 | 髄液 | 脳脊液 |
|---------------------------------|----|----|---|----|----|-----|
| 無処理 (対照例)                       | +  | +  | + | +  | +  | +   |
| PCA 処理 [本発明 (4-1)]              | -  | -  | - | -  | -  | -   |
| TCA 処理 [本発明 (4-2)]              | -  | -  | - | -  | -  | -   |
| HNO <sub>3</sub> 処理 [本発明 (4-3)] | -  | -  | - | -  | -  | -   |
| 加熱処理 [比較例 1 (4-6)]              | -  | -  | - | -  | -  | -   |
| アルカリ処理 [比較例 2 (4-7)]            | -  | -  | - | -  | -  | -   |
| クロロホルム処理 [比較例 3 (4-4)]          | +  | +  | + | +  | +  | +   |
| 酸性化処理 [比較例 4 (4-5)]             | +  | +  | + | +  | +  | +   |

(記号) (エンドトキシン *E. Coli* O<sub>111</sub>B<sub>6</sub>)

換算値 / ml 生体試料)

|   |                   |
|---|-------------------|
| - | 30 pg >           |
| ± | 30 $\sim$ 70 pg   |
| + | 70 $\sim$ 170 pg  |
| + | 170 $\sim$ 700 pg |
| + | 700 pg <          |

上掲第 1 表の結果に示されているように、本発明方法に従つて酸処理された生体試料及び比較試料中、加熱処理ならびにアルカリ処理された生体試料では、試料中のアミダーゼ活性の残存は認められず、消失していることがわかる。しかしながら、比較試料中、クロロホルム処理ならびに酸性化処理された生体試料においては、対照試料 (無処理) よりアミダーゼ活性が大となつたり或はアミダーゼ活性は実質的に消失せず、カプトガニ炭



固系酵素基質切断活性が留保されており、生体試料中の真のエンドトキシン量を正確に測定することは不可能であることがわかる。

尚、第1表に於て、対照試料（無処理）に示されているように、他の生体試料とは異つて髄液には、通常、アミダーゼ活性は見られない。しかし試料採取時や患者症状によつて、血液の混入などの原因でアミダーゼ活性の認められる場合がある。上記実験の結果、生体試料中のアミダーゼ活性が完全に消失していることのわかつた試料について、以下の実施例2及び比較例5、6のテストを行つた。

#### 実施例2及び比較例5、6

前記実施例1及び比較例1～4で得られた結果に基いて、生体試料中のアミダーゼ活性を完全に消失せしめることのわかつた本発明酸処理及び比較のための加熱処理ならびにアルカリ処理を採用

してテストを行つた。

後掲第2表に示した生体試料に、予め定められた既知量のエンドトキシンを添加した後、実施例1及び比較例1、2と同様に処理した試料群、及びこれら生体試料を同様に処理した後、予め定められた既知量のエンドトキシンを添加した試料群について、前記(2)に記載の方法で、該エンドトキシン量に対する検出測定されたエンドトキシン量の割合(%)で検出率を示す。

テストの結果を下掲第2表に示した。尚、第2表には、本発明酸処理生体試料前記(4-1)～(4-3)中、PCA処理試料についてのデータを代表例として示したが、他の本発明試料についても、ほぼ同様な結果が得られた。

又、表中、(×3)、(×6)、(×9)は、夫々、(測定時における)試料の希釈倍率を示す。

第2表 (添加エンドトキシンの検出率%)

| 生 体 試 料                  |                  | 血漿                               | 血清                               | 尿   | 腹水       | 髄液  | 関節液      |
|--------------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----|----------|-----|----------|
| PCA処理<br>〔本発明<br>(4-1)〕  | エンドトキシン<br>添加後処理 | (×3) 95                          | (×3) 95                          | 98  | (×6) 110 | 100 | (×6) 106 |
|                          |                  | (×6) 105                         | (×6) 102                         |     |          |     |          |
|                          |                  | (×9) 104                         | (×9) 105                         |     |          |     |          |
|                          | エンドトキシン<br>添加前処理 | (×3) 108<br>(×6) 105<br>(×9) 105 | (×3) 101<br>(×6) 106<br>(×9) 104 | 101 | (×6) 105 | 100 | (×6) 115 |
| 加熱処理<br>(比較例<br>5)       | エンドトキシン<br>添加後処理 | (×3) 12<br>(×6) 26<br>(×9) 58    | (×3) 2<br>(×6) 18<br>(×9) 42     | 74  | (×6) 45  | 100 | (×6) 44  |
|                          |                  | (×3) 121<br>(×6) 158<br>(×9) 205 | (×3) 21<br>(×6) 44<br>(×9) 68    |     |          |     |          |
|                          |                  | (×3) 121<br>(×6) 158<br>(×9) 205 | (×3) 21<br>(×6) 44<br>(×9) 68    |     |          |     |          |
|                          | エンドトキシン<br>添加前処理 | (×3) 121<br>(×6) 158<br>(×9) 205 | (×3) 21<br>(×6) 44<br>(×9) 68    | 82  | (×6) 60  | 100 | (×6) 145 |
| アルカリ<br>処理<br>(比較例<br>6) | エンドトキシン<br>添加後処理 | (×3) 26<br>(×6) 97<br>(×9) 121   | (×3) 13<br>(×6) 23<br>(×9) 37    | 78  | (×6) 63  | 100 | (×6) 49  |
|                          |                  | (×3) 29<br>(×6) 71<br>(×9) 105   | (×3) 39<br>(×6) 58<br>(×9) 60    |     |          |     |          |
|                          |                  | (×3) 29<br>(×6) 71<br>(×9) 105   | (×3) 39<br>(×6) 58<br>(×9) 60    |     |          |     |          |
|                          | エンドトキシン<br>添加前処理 | (×3) 29<br>(×6) 71<br>(×9) 105   | (×3) 39<br>(×6) 58<br>(×9) 60    | 86  | (×6) 77  | 100 | (×6) 162 |

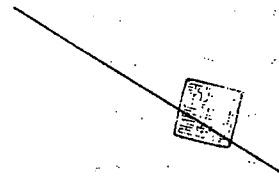
上掲第2表に明らかとなり、前記第1表に示したテストに於て生体試料中のアミダーゼ活性の消失が認められた加熱処理試料又はアルカリ処理試料を用いた測定結果は、添加したエンドトキシンの量と相関関係を全く示さずに、添加したエンドトキシンのほんの一部しか検出されなかつたり或は又数倍の検出率を示したりすること、更に試料の希釈の度合によつて検出率が大幅に変化することがわかる。斯して、これら比較例の手法で処理された生体試料を用いて、試料中の真のエンドトキシンの量を正確に且つ信頼性をもつて再現性よく検出測定することはできないことがわかる。

これに対して、本発明の酸処理生体試料を用いた場合には、生体試料の種類、エンドトキシンの添加時が処理の前の場合と後の場合との相違、希釈の度合などに、拘わりなしに、ほぼ100%の検出率で、正確に且つ信頼性をもつて再現性よく

検出測定することが可能となることがわかる。

更に、上記実施例2及び比較例5、6に於けると同様にして、血漿及び血清を生体試料として処理した後、夫々の試料中に残存する蛋白を、

Lowry法 (O. H. Lowry, et al; J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)) により定量した。結果を下掲第3表に示した。尚、表中の数値の単位は $\mu$ 蛋白/ $ml$ 試料であり、数値は8回の実験の平均値で示してある。血漿の欄の下段は使用した抗凝固剤を示す。



第3表

| 処理法                | 血 漿  |      |      | 血 清  |
|--------------------|------|------|------|------|
|                    | ヘパリン | クエン酸 | EDTA |      |
| 未処理<br>(対照)        | 75.0 | 77.0 | 77.0 | 68.0 |
| PCA<br>処理<br>(本発明) | <2   | <2   | <2   | <2   |
| 加熱処理<br>(比較)       | 67.2 | 61.6 | 51.9 | 64.9 |
| アルカリ<br>処理<br>(比較) | 75.6 | 64.5 | 75.9 | 61.6 |

上掲第3表の実験結果に示されているように、未処理(対照)試料中の蛋白が、比較処理例の加熱処理及びアルカリ処理では、ほとんど除去されていないのに対し、本発明の酸処理を行つた場合には $<2 \mu$ / $ml$ オーダーの極めて微量にまで充分

な除蛋白効果が達成されていることがわかる。

周知のように、血中成分がカプトガニ凝固系酵素と交差反応をすることや一般的な蛋白の保護効果などからみて、測定しようとするエンドトキシンに実質的な失活作用を及ぼすことなしに充分な除蛋白効果を達成することは、測定の正確性、信頼性、再現性などの点から極めて望ましいことである。そして、上掲第3表及び前掲第2表の実験結果から、本発明方法によれば、このような希望が有利に達成されることが理解できる。

#### 実施例3

生体試料中に存在する測定しようとするエンドトキシンに対して吸着能を有する蛋白質類や細胞顆粒の如き妨害因子を、エンドトキシンに不適合な失活作用を及ぼすことなしに、分解乃至変性除去できることが、本発明方法における酸処理の最も重要な特色である。

本発明方法における上記特色の優れた作用効果を示すために、本発明のPCA処理、TCA処理、 $HNO_3$ 処理の場合を例に、これら処理を行つた血漿試料（PRP：前記(1)参照）、並びに生理食塩液中の添加エンドトキシン（*E. coli* O<sub>111</sub>, B<sub>4</sub>）の検出率及び該処理血漿試料（PRP）中の残存アミダーゼ活性を測定した結果を後掲第4表に示す。測定は以下のようにして行つた。

健常血漿0.1mlに、血漿1ml当り1000pgになるようにエンドトキシン溶液を添加したのち、5%PCA水溶液、5%TCA水溶液及び3% $HNO_3$ 水溶液を、夫々、添加して、各試料の終濃度が、0%（対照：添加せず）、0.5%、1%、1.25%、2.0%、2.5%、5%及び10%となるように調製した。これら試料を37℃で10分間インキュベートし、次いで3000rpm、15分の条件下に遠心処理して、上澄液50～100

μlを採取し、0.1～0.2NのNaOH水溶液を用いてpH7.5となるように中和して、これを被検試料液とした。エンドトキシンの測定は、前記(2)に記載の方法に従つて、合成基質として前記(3)に記載したペプチド性合成基質を用いて行つた。

更に、対照として、血漿試料の代りに生理食塩水（注射用）を用いて同様なテストを行い、その測定値を100として、検出率（%）を算出した。

又、健常者の血漿試料（PRP）に、前記エンドトキシン溶液の代りに、生理食塩水を添加したのち、前記同様に、PCA処理、TCA処理及び $HNO_3$ 処理した試料群について、上記と同様にして、残存アミダーゼ活性を測定した。



第4表

| 処理薬剤<br>薬剤濃度<br>(終濃度)<br>% | PCA         |       |              | TCA         |       |              | $HNO_3$     |       |              |
|----------------------------|-------------|-------|--------------|-------------|-------|--------------|-------------|-------|--------------|
|                            | エンドトキシン検出率% |       | アミダーゼ<br>活性% | エンドトキシン検出率% |       | アミダーゼ<br>活性% | エンドトキシン検出率% |       | アミダーゼ<br>活性% |
|                            | 血漿          | 生理食塩水 |              | 血漿          | 生理食塩水 |              | 血漿          | 生理食塩水 |              |
| 未処理                        | -           | 100   | 100          | -           | 100   | 100          | -           | 100   | 100          |
| 0.5                        | 100         | 100   | 5            | 100         | 100   | 9            | 100         | 100   | 12           |
| 1.0                        | 100         | 100   | 0            | 100         | 100   | 2            | 100         | 100   | 5            |
| 1.25                       | 100         | 100   | 0            | 100         | 100   | 0            | 100         | 100   | 4            |
| 2.0                        | 100         | 98    | 0            | 100         | 100   | 0            | 100         | 93    | 0            |
| 2.5                        | 75          | 70    | 0            | 100         | 100   | 0            | 82          | 77    | 0            |
| 5.0                        | 65          | 60    | 0            | 85          | 80    | 0            | 74          | 70    | 0            |
| 10.0                       | 40          | 35    | 0            | 63          | 60    | 0            | 54          | 50    | 0            |

上掲第4表の結果に一例を示したように、酸処理剤の種類によつて、或る濃度以上になると、血漿試料又は生理食塩水中でのエンドトキシンそれ自体の分解と予測される検出率の低下が見られるが、本発明方法によれば、酸処理剤の種類及び／又は処理条件などを予め実験的に適宜に選択設定することによつて、アミダーゼ活性の影響の無視し得る条件下で、生体試料中のエンドトキシンの真の値を、正確に且つ高度な信頼性をもつて再現性良く、検出測定できることが容易に理解できよう。

以下、更に臨床データにより、本発明方法実施の教例について説明する。

#### 実施例4

健康人及びエンドトキシン血症患者から、前記(1)に記載の手法で採取した血漿試料(PRP)を用い、本発明方法に従つてPCA処理した酸処理P

RPを用い、前記(2)の測定手法に従つて、前記(3)記載のペプチド性合成基質を用いて、これら処理血漿試料中のエンドトキシンの実測を行つた。

その結果を、添付第1図に示した。第1図の例に示されているように、健康人(normal: 図中A)に於ては、エンドトキシンは0~0.02 ng/mlの間に集つて分布していることがわかる。これに対して、エンドトキシン血症患者群[図中、Bは肝炎(hepatitis)患者、Cは肝硬変(liver cirrhosis)患者、Dは感染症(sepsis)患者、Eは悪性腫瘍(malignant tumor)患者、Fは白血病(leukemia)患者]に於ては、エンドトキシンは0~1 ng/mlの広い範囲にわたつて、夫々、異なつた分布様式で分布しており、健康人とは明瞭に区別できる分布状態を示しており、本発明方法によつて、エンドトキシンを正確に且つ高度な信頼性をもつて再現性良く検出測定できる

事実と相俟つて、本発明方法が、診断上、きわめて有力な手段として注目すべき手法を提供するものであることが理解できよう。

#### 実施例5

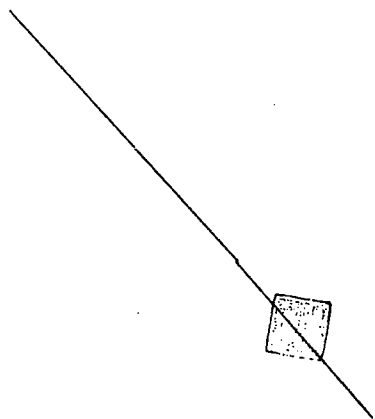
T, K, 敗血症(endotoxemia)患者(389)の血漿試料、U, H, 肝硬変症(liver cirrhosis)患者(678)の血清試料、M, S, 尿路感染症患者(439)の尿試料、S, O, 膵胆管癌患者(548)の腹水試料について、前実施例4と同様にしてエンドトキシン検出測定を行ない、エンドトキシンの確認されたこれら生体試料に検出測定されたエンドトキシン量と同量のエンドトキシンE, Coli O<sub>111</sub>, B<sub>4</sub>を、添加して、エンドトキシンの検出測定を行つた。

上記生体試料の夫々について、各々、PCA処理、TCA処理、HNO<sub>3</sub>処理した酸処理試料群を作成し、上記エンドトキシン溶液を、各試料につ

いて最初の検出測定テストで測定されたエンドトキシン量の2倍の濃度となるように、これら各試料に添加したのち、前実施例4と同様にして、エンドトキシンを測定した。上記処理を、エンドトキシン溶液の添加後に行つた試料群についても、同様なテストを行つた。

その結果を、後掲表5~表8に示した。これら表に示した結果から明らかなように、病氣及び生体試料の種類に如何に拘わらずに、添加したエンドトキシンのほぼ100%が回収され、更に、この結果は、生体試料の酸処理前にエンドトキシンを添加しても、酸処理後に添加しても同様であることがわかる。このことは、本発明方法に従つて酸処理した場合には、添加エンドトキシンが、なんらの失活変性も生ずることがなく、更に、添加したエンドトキシンと被検液との間の相互作用による検出阻害や増感などの不都合な非特異的現象

も伴わずに、添加したエンドトキシンがほぼ理論量で回収できることを意味し、本発明方法による測定結果の優れた正確さ及び高度な信頼性ならびに再現性を一層明らかにするものである。



第5表 (血漿：病名、敗血症)

| 酸処理法                | アミダーゼ活性 | エンドトキシン検出量 (ng/ml) | エンドトキシンの添加時期 | 回収率 (%) |
|---------------------|---------|--------------------|--------------|---------|
| PCA処理               | 0       | 0.73               | 酸処理前         | 108     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 102     |
| TCA処理               | 0       | 0.76               | 酸処理前         | 105     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 100     |
| HNO <sub>3</sub> 処理 | 0       | 0.75               | 酸処理前         | 100     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 98      |

第6表 (血清：病名、肝硬変)

| 酸処理法                | アミダーゼ活性 | エンドトキシン検出量 (ng/ml) | エンドトキシンの添加時期 | 回収率 (%) |
|---------------------|---------|--------------------|--------------|---------|
| PCA処理               | 0       | 0.15               | 酸処理前         | 110     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 109     |
| TCA処理               | 0       | 0.14               | 酸処理前         | 108     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 108     |
| HNO <sub>3</sub> 処理 | 0       | 0.15               | 酸処理前         | 111     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 100     |

第7表 (尿：病名、尿路感染症)

| 酸処理法                | アミダーゼ活性 | エンドトキシン検出量 (ng/ml) | エンドトキシンの添加時期 | 回収率 (%) |
|---------------------|---------|--------------------|--------------|---------|
| PCA処理               | 0       | 1.0                | 酸処理前         | 104     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 101     |
| TCA処理               | 0       | 1.2                | 酸処理前         | 108     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 109     |
| HNO <sub>3</sub> 処理 | 0       | 1.1                | 酸処理前         | 110     |
|                     |         |                    | 酸処理後         | 108     |

第8表 (腹水：病名、腔胆管癌)

| 酸処理法                | アミダーゼ<br>活性 | エンドトキシン<br>検出量 (ng/ml) | エンドトキシン<br>の添加時期 | 回収率<br>(%) |
|---------------------|-------------|------------------------|------------------|------------|
| PCA処理               | 0           | 10                     | 酸処理前             | 102        |
|                     |             |                        | 酸処理後             | 100        |
| TCA処理               | 0           | 10                     | 酸処理前             | 97         |
|                     |             |                        | 酸処理後             | 100        |
| HNO <sub>3</sub> 処理 | 0           | 9                      | 酸処理前             | 100        |
|                     |             |                        | 酸処理後             | 110        |

## 4. 図面の簡単な説明

添付第1図は、実施例4に記載したエンドトキシン測定の結果を示す図面である。

特許出願人 生化学工業株式会社

代理人 弁理士 小田島 平吉

外1名

## 手 続 補 正 書

昭和58年2月14日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

## 1. 事件の表示

特開昭56-182190号

## 2. 発明の名称

エンドトキシン測定法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋本町二丁目九番地八

名 称 生化学工業株式会社  
(氏 名)

## 4. 代 理 人 干 107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自転車会館

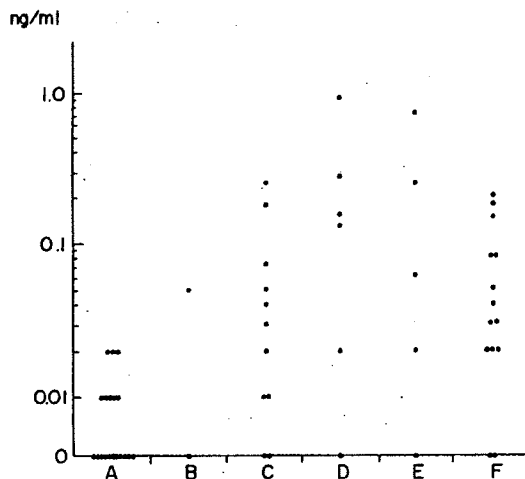
氏 名 (6078) 弁理士 小 田 島 平 吉  
(外1名)

( 目 的 )

5. 補正命令の日付 昭和 年 月 日 (発達日)

6. 補正の対象 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容 別紙のとおり。



第1図

- (1) 明細書第7頁9行に、「
- $O_{111}$
- 」とあるを、

『 $O_{111}$ 』

と訂正する。

- (2) 明細書第9頁7行に、「
- P. B. Reinhold*
- 」

とあるを、

『*R. B. Reinhold*』

と訂正する。

- (3) 明細書第9頁8行に、「
- Biol.*
- 」とあるを、

『*Biol.*』

と訂正する。

- (4) 明細書第9頁10行に、「(1)」とあるを、

『(4)』

と訂正する。

- (5) 明細書第13頁11行に「酸処理する。」

とある後に、

『すなわち、該生体試料中のエンドトキシン非依存性酵素活性 (*hydrolytic activity of*

- (9) 明細書第32頁の第3表中、
- PCA*
- 処理

(本発明)の各欄に、夫々、「 $<2$ 」とあるを、『 $<1$ 』

と訂正する。

- (10) 明細書第32頁の第3表のアルカリ処理

(比較)の下に表の各欄に対応して、以下のとおり

加入する。

|                   |       |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| 酸性化<br>処理<br>(比較) | 7 2 3 | 6 7.3 | 6 7.7 | 6 4.3 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|

- (11) 明細書第32頁下から4行に、「及びアルカリ処理」とあるを、

『、アルカリ処理及び酸性化处理』

と訂正する。

- (12) 明細書第32頁末行に、「
- $<2$
- mg/ml」と

あるを、

『 $<1$  mg/ml』

endotoxin-independent enzymes)が検出

されなくなるように酸処理する。』

と加入する。

- (6) 明細書第20頁7行及び第21頁4行に、

夫々、「 $O_{111}$ 」とあるを、『 $O_{111}$ 』

と訂正する。

- (7) 明細書第23頁下から4行に、「
- Lancet*

1 1 2 7 2 (1 9 7 4)」とあるを、

『*Lancet* (1) 1 2 7 2 (1 9 7 5)』

と訂正する。

- (8) 明細書第31頁10行に、「示す。」とあ

る後に、

『更に、表中には前記(4-5)比較例[酸性化处理]で得た生体試料についても同様に行つた蛋白定量の結果を示した。』

と加入する。

と訂正する。

- (13) 明細書第33頁下から6行に、「存在する」

とある後に、

『*LAL-Test* 阻害因子及びアミダーゼ活性、

さらに』

と加入する。

- (14) 明細書第34頁2〜5行に、「本発明の・

・・(*E. coli*,  $O_{111} B_4$ )とあるを、『*E. coli*  $O_{111} B_4$  由来のエンドトキシンを添加した血漿サンプルを本発明の *PCA* 処理、*TCA* 処理、*HNO<sub>3</sub>* 処理に試した場合を例に、これら酸処理を行つた血漿試料(*PRP*:前記(1)参照)、並びに生理食塩液に *E. coli* $O_{111} B_4$  由来のエンドトキシンを添加したのち、

上記各々の酸処理を行つた三つのコントロール

試料について、添加したエンドトキシン』

と訂正する。

03 明細書第34頁11行に、「5%PCA水  
溶液、5%TCA水溶液及び3%」とあるを、

「PCA水溶液、TCA水溶液及び」

と訂正する。

04 明細書第35頁2行に、「pH7.5」とあ  
るを、

「pH6.5～8.0」

と訂正する。

05 明細書第36頁の第4表を以下のとおり訂  
正する。

第4表

| 処理用の試料<br>の終濃度(%) | PCA         |                   |                   | TCA         |                   |                   | HNO <sub>3</sub> |                   |                   |
|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                   | エンドトキシン検出率% |                   | *アミダ<br>ーゼ<br>活性% | エンドトキシン検出率% |                   | *アミダ<br>ーゼ<br>活性% | エンドトキシン検出率%      |                   | *アミダ<br>ーゼ<br>活性% |
|                   | 血漿          | 生理食塩水<br>(コントロール) |                   | 血漿          | 生理食塩水<br>(コントロール) |                   | 血漿               | 生理食塩水<br>(コントロール) |                   |
| 未処理               | -           | 100               | 100               | -           | 100               | 100               | -                | 100               | 100               |
| 0.5               | 100         | 100               | 5                 | 100         | 100               | 4                 | 100              | 100               | 12                |
| 1.0               | 100         | 100               | 0                 | 100         | 100               | 2                 | 100              | 100               | 5                 |
| 1.25              | 100         | 100               | 0                 | 100         | 100               | 0                 | 100              | 100               | 4                 |
| 2.0               | 100         | 98                | 0                 | 100         | 100               | 0                 | 100              | 93                | 0                 |
| 2.5               | 75          | 70                | 0                 | 100         | 100               | 0                 | 82               | 77                | 0                 |
| 5.0               | 65          | 60                | 0                 | 85          | 80                | 0                 | 74               | 70                | 0                 |
| 10.0              | 40          | 35                | 0                 | 63          | 60                | 0                 | 54               | 50                | 0                 |

\* 酸処理した試料中のエンドトキシン非依存性酵素活性



08 明細書第39頁下から5行に「O<sub>III</sub>」とあるを、

『O<sub>III</sub>』

と訂正する。

09 明細書第45頁の表の後に、行を改めて、以下のとおり加入する。

『 以上に詳しく述べたとおり、本発明によれば生体試料たとえば体液やその調製物中のエンドトキシンを優れた正確性、信頼性及び再現性をもつて検出測定することができる。したがって、本発明方法の実施に利用できるエンドトキシン測定用具として、例えば $pK_a^{25^\circ C}$ 値が3以下の酸(a)とカプトガニ・アモボサイト・ライゼート成分(b)との組み合わせもしくはこの組み合わせを含むエンドトキシン測定用キットを例示することができる。すなわち、本発明方法の実施に利用できる測定用キットとして、被験試料の

酸処理用の $pK_a^{25^\circ C}$ 値が3以下の酸(a)を収容した容器及びカプトガニ・アモボサイト・ライゼート成分(b)を収容した容器の組み合わせもしくはこの組み合わせを含む測定用キットが提供できる。

このような測定用キットは、さらにエンドトキシン測定用合成基質、中和用アルカリ、稀釈用もしくは溶解用の緩衝液、カップリング試薬、酵素反応停止剤、蒸留水その他の稀釈用液などの如き、測定に利用する各種の剤を収容した容器を、適宜、更に組み合せたキットの形態とすることができる。』